

Sonderabdruck
aus „Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung“
136. Band, 5. Heft, 1968, Seite 271—278

J. F. Bergmann, München | Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg · New York

Veränderungen von Milchproteinen durch Einwirkung von Carbonylverbindungen

I. Mitteilung

Reaktion von Casein mit Äthanal*

J. SCHORMÜLLER, E. GRAMPP** und H.-D. BELITZ

Mitteilung aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltechnologie
der Technischen Universität Berlin***

Eingegangen am 24. Juli 1967

In vielen Lebensmitteln, insbesondere in fetthaltigen Produkten, entstehen bei der Lagerung oder bei Erhitzungsprozessen in größerem Umfang Carbonylverbindungen, die mit vorhandenen Proteinen reagieren können. Uns interessierten derartige

* Herrn Kollegen Prof. Dr. LEOPOLD SCHMID zum 70. Geburtstag verehrungsvoll zugeeignet. Auszug aus der Promotionsarbeit von E. GRAMPP: „Lagerungsbedingte Reaktionen der Membranproteine schaum- und sprühgetrockneter Vollmilch mit Carbonylverbindungen“. Diss. Techn. Univ. Berlin 1966 (D 83).

** Enzym-Laboratorium der Fa. Röhm & Haas, Darmstadt.

*** Diese Untersuchung wurde teilweise durch eine Beihilfe des United States Department of Agriculture unter P. L. 480 finanziert. Für die großzügige Unterstützung danken wir verbindlich.

Reaktionen im Zusammenhang mit Lagerveränderungen bei Milchpulvern verschiedener Herstellung. Hier sind speziell zwischen Membranproteinen und Carbonylverbindungen Umsetzungen zu erwarten. In Modellversuchen mit Casein und Äthanal sollte zunächst geklärt werden, welche analytischen Methoden zur Erfassung solcher Reaktionen geeignet sind. Casein wurde für diese Versuche gewählt, weil es in homogenisierter Milch Anteil am Aufbau der Fettkügelchenmembranen hat (vgl. dazu BRUNNER und Mitarb.; 1, 2, 3). Äthanal ist sehr reaktionsfähig und es gehört nach SCHORMÜLLER u. WALTHER (4) noch mit zu den in Milchpulvern in größeren Mengen auftretenden Carbonylverbindungen.

Experimentelle Angaben

1. Casein

Das verwendete Casein wurde aus frischer Vollmilch nach HIPP (5) hergestellt. Das frisch gefällte Casein wurde zur Entfernung von Fettresten 24 Std mit Alkohol-Äther-Gemisch gerührt. Anschließend wurde abgesaugt, mit Äther gewaschen und über P_2O_5 im Vakuum getrocknet.

2. Umsetzung mit Äthanal

Je 2 g Casein wurden in 20 ml Wasser bei pH 6,5 und Zimmertemperatur mit 8 ml einer 10%igen Lösung von Äthanal in Wasser umgesetzt. Nach Reaktionszeiten von 5, 15, 60 und 120 min wurde das Protein mit 10%iger Trichloressigsäure gefällt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Das umgesetzte Casein ist im Folgenden mit $C_{R,5}$, $C_{R,15}$, $C_{R,60}$ und $C_{R,120}$ das nichtumgesetzte Casein mit C_U bezeichnet.

3. Trennung an DEAE-Cellulose

C_U und $C_{R,120}$ wurden an DEAE-Cellulose nach der Methode von YAGUCHI (6) chromatographiert.

4. Elektrophorese in Polyacrylamidgel

Das verwendete Gerät wurde in Anlehnung an die Angaben von BLOEMENDAL (7) gebaut. Ein rundes Plastikgefäß (PVC) mit einem 10 cm hohen Rand wurde auf ein 1 l Becherglas aufgesetzt, das etwa 400 ml Puffer enthielt. Sechs Löcher in 3 verschiedenen Größen (14, 11 und 9 mm \varnothing) mit Ansatzstutzen waren so am Boden des Gefäßes angebracht, daß darin 6 kleine Glassäulen, gefüllt mit Gel, dichtschießend eingesetzt werden können. Der Plastikbehälter wurde ebenfalls mit Puffer gefüllt und als Kathodenraum geschaltet. Als Elektroden wurden dünne Platinbleche mit einer Oberfläche von etwa 15 cm² benutzt.

Das Gel wurde nach BARKA (8) durch Vermischen gleicher Volumina folgender Lösungen hergestellt:

1. 30 g Acrylamid (Fluka AG) und 0,8 g N, N-Methylenbisacrylamid (Fluka AG) in 100 ml Wasser.
2. 1,6 g β -Dimethylaminopropionitril (Fluka) in 100 ml Wasser.
3. 0,03 g Kaliumeisen(II)-cyanid in 100 ml Wasser.
4. 0,48 g Ammoniumperoxy-disulfat in 100 ml Wasser.

Das Gemisch wurde in die unten verstopften, etwa 60—70 mm langen Glasröhrchen bis zu einer Höhe von 50 mm eingefüllt und 45 min in ein Wasserbad von 37° C eingehängt. Danach wurden Wasser und überstehende Lösung entfernt; nach 1 Std war das Gel gebrauchsfertig. Die gefüllten Röhrchen wurden in der verwendeten Pufferlösung aufbewahrt, einem Veronalpuffer pH 8,9 (Ionenstärke $I/2 = 0,05$), der 4,8 molar an Harnstoff war.

0,020 bis 0,030 ml der entsprechenden Caseinlösung (100 mg pro ml Puffer, 7 molar an Harnstoff) wurden der Pufferlösung an der Oberfläche des Gels vorsichtig unterschichtet. Der Puffer im unteren Gefäß wurde während des Versuchs durch Wasserkühlung auf 11° C gehalten. Es wurde eine Arbeitsspannung von 20 V/cm (7—9 mA) benutzt. Nach 45 min Elektrophorese wurde der Gelkörper mit Hilfe einer Injektionsspritze aus dem Glasröhrchen herausgeholt und 30 min in einer 0,25%igen Amidoschwarzlösung (Amidoschwarz 10 B in Methanol-Wasser-Eisessig, 50-50-10, v-v-v) angefärbt. Der Überschuß an Farbstoff wurde durch Auswaschen mit dem Lösungsmittel entfernt.

5. Sedimentationsanalyse

Die Sedimentationsversuche wurden in einem linearen Zuckergradienten durchgeführt (9). Der Gradient wurde aus je 5 ml Lösung der beiden Grenzkonzentrationen (40%ige und 20%ige Saccharoselösung in 0,05 m-Tris-HCl-Puffer pH 7,5) in den Celluloidzentrifugenröhrchen hergestellt und stand vor dem Lauf 16—17 Std bei 3° C (10). Nach dem Stehen wurde mit 0,15 ml einer

3%igen Proteinlösung im gleichen Puffer überschichtet. Die Röhrchen wurden fest verschlossen und im Rotor 40 der präparativen Ultrazentrifuge, Spinco Modell L (Beckman) zentrifugiert. Bei den Angaben über die Zentrifugierdauer wurden die zur Beschleunigung und Verzögerung benötigten Zeiten berücksichtigt. Nach beendeter Zentrifugation wurden die Celluloidröhrchen vorsichtig aus dem Rotor genommen und am Boden mit einer Nadel angestochen. Die sehr langsam ausfließende Lösung wurde in 0,7—0,8 ml-Fractionen aufgefangen. In den Fractionen wurde nach dem Verdünnen mit 3,5 ml Wasser die Extinktion bei 280 nm gemessen.

6. Gelfiltration

18 g Sephadex G 100 (Pharmacia) wurden 24 Std in 0,02 m-Phosphatpuffer pH 7,2, der 0,8 molar an Ammonsulfat war, gequollen. Das Gel wurde wiederholt aufgeschlämmt, feine Partikel wurden dekantiert. Anschließend wurde das Gel in einer Säule von 30 mm Durchmesser gefüllt (11). Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Proteinen von bekanntem Molekulargewicht aufgestellt. Dazu wurden je 15 mg Protein in 1 ml des genannten Puffers auf die Säule gegeben und mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden 4 ml-Fractionen gesammelt, deren Extinktionen bei 280 nm gemessen werden. Lactatdehydrogenase wurde durch optischen Test, Hämoglobin bei 540 nm gemessen. Mit den Caseinen wurde in gleicher Weise verfahren. Die Bestimmung erfolgte bei 280 nm.

7. Hydrolyse mit Trypsin

Je 50 mg Protein wurden in 9 ml 0,05 m-Phosphatpuffer pH 7,2 gelöst, mit 0,5 mg Trypsin (Serva, 2 × krist., reinst) in 1 ml Puffer versetzt und bei 37° C bebrütet. Der Verlauf der Hydrolyse wurde durch Ninhydrinanfärbung von 0,1 ml-Proben (12, 13) verfolgt.

8. Dünnschichtchromatographie tryptischer Hydrolysate

Die tryptische Hydrolyse erfolgte über 24 Std in der unter 7. beschriebenen Weise. Nur wurde nicht in Puffer gearbeitet, sondern der pH Wert wurde durch Zugabe von 0,1 n-NaOH auf 7,2 gehalten. Chromatographiert wurden je 10 µl (= 50 µg Protein) auf Kieselgel G-Schichten (Merck) von 0,25 mm Dicke, mit den Fließmitteln n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1, v:v), Chloroform/Methanol/17%iges Ammoniak (2:1:1, v:v), Phenol/Wasser (75:25, g:g). Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin (0,3%ig in n-Butanol).

9. Bestimmung der Michaeliskonstanten

Zu 2 ml wäßriger Proteinlösungen verschiedener Konzentrationen (0,2—20 mg/ml) wurden je 1 ml wäßriger Trypsinlösung (0,5 mg/ml) gegeben; die Ansätze wurden mit 5 ml 0,05 m-Phosphatpuffer pH 8,0 versetzt und mit Wasser auf 8 ml aufgefüllt. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml 10%iger Trichloressigsäure abgebrochen. Nach Filtration wurde bei 280 nm gegen Blindwert gemessen. Die Michaeliskonstanten und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden auf graphischem Wege nach LINEWEAVER und BURK (14) durch Auftragen von $[s]/E$ gegen $[s]$ erhalten ($[s]$: Proteinkonzentration; E : Extinktion bei 280 nm).

10. Reaktion mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol

Je 150 mg Protein wurden in 10 ml 0,05 m-KCl gelöst, mit 0,05 n-KOH auf pH 8,0 eingestellt und mit 0,3 ml FDNB (Merck) versetzt. Nach 120 min bei 40° C und pH 8,0 im pH-Staten wurde überschüssiges Reagens ausgethert. Das DNP-Protein wurde mit 60%iger Trichloressigsäure gefällt, abzentrifugiert, mit Aceton/Wasser, Aceton und Äther gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Die Extinktion der DNP-Proteine wurden in 1%iger Hydrogencarbonatlösung bei 355 nm gemessen. Zur Bestimmung von ϵ -DNP-Lysin wurde der Reaktionsansatz nach dem Ausäthern — ohne Isolierung des DNP-Proteins — mit dem gleichen Volumen konz. HCl versetzt und 20 Std am Rückfluß hydrolysiert. Anschließend wurde eingengt und mit Wasser so weit verdünnt, daß die Lösung etwa normal an HCl war. Nach mehrmaligem Ausäthern wurde die wäßrige Phase zur Trockne eingengt und in 2 ml 1%iger Hydrogencarbonatlösung aufgenommen. Je 10 µl dieser Lösung wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel G mit n-Propanol/Ammoniak (70:30, v:v) aufgetrennt. Der dem ϵ -DNP-Lysin entsprechende Fleck ($R_f = 0,56$) wurde abgekratzt und das Kieselgel mit 4 ml 1%iger Hydrogencarbonatlösung extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die Lösung gegen einen Leerwert bei 360 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von ϵ -DNP-Lysin wurde in Vorversuchen zu 16800 bestimmt. Die Hydrolysenverluste lagen unter den angegebenen Bedingungen bei 27%. Die erhaltenen Werte wurden entsprechend korrigiert.

11. Aminosäureanalysen

Die Proteine wurden mit 6 n-HCl (3 × destilliert) 24 Std am Rückfluß hydrolysiert (Verdünnung 1:10000). Die Analysen erfolgten mit dem Aminomaten (Fa. Bender & Hobein, München) nach dem Verfahren von HANNIG (21).

Ergebnisse

Die Abb. 1 und 2 zeigen das unterschiedliche chromatographische Verhalten von nicht-umgesetztem Casein (C_U) und Casein nach 120 min Reaktion mit Äthanal ($C_{R, 120}$) an DEAE-Cellulose. Während das Chromatogramm von C_U im wesentlichen den Angaben von YAGUCHI (6) entspricht, erscheint bei $C_{R, 120}$ die Hauptmenge der Substanz in einem Peak, etwa im Bereich der β -Caseinfractionen (vgl. Abb. 1). Die sehr weitgehende Differenzierung von C_R ist bei $C_{R, 120}$ aufgehoben. Die Elution der überwiegenden Menge von $C_{R, 120}$ mit — im Vergleich zu C_U — niedrigeren NaCl-Konzentrationen deutet auf eine Abnahme der negativen Überschußladung.

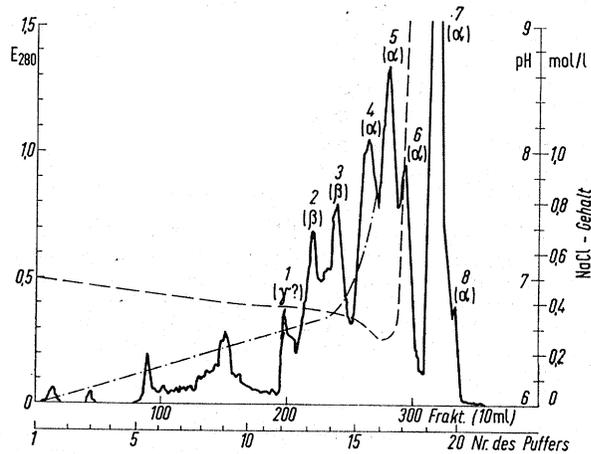


Abb. 1. Chromatographie von Gesamtcasein an DEAE-Cellulose. pH: — — — —, NaCl: — · — · —

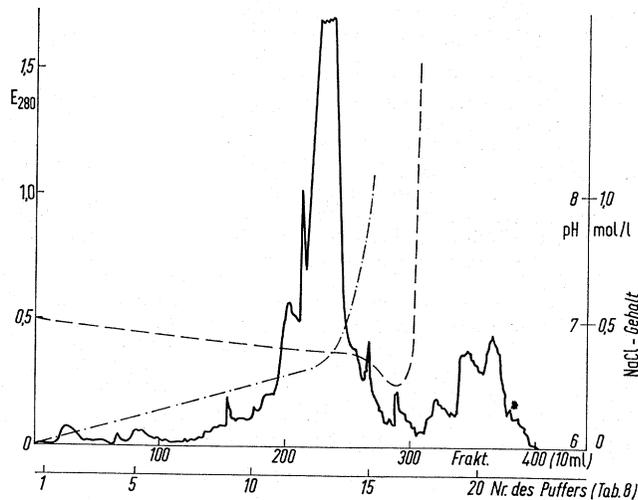


Abb. 2. Chromatographie von mit Äthanal umgesetztem Casein an DEAE-Cellulose. pH: — — — —
NaCl: — · — · —

Zu dem gleichen Ergebnis führte die *Elektrophorese in Polyacrylamidgel* (Abb. 3). C_U zeigt — neben einer Startzone — drei α -Casein- und vier β -Casein-Banden. Bei $C_{R, 120}$ ist dagegen — wieder neben einer nicht ausgewanderten Zone am Start — im α -Casein- und im β -Casein jeweils nur noch eine Bande vorhanden. Vergleicht man diese beiden Banden von $C_{R, 120}$ mit den am weitesten in Richtung Anode gelaufenen Zonen der α - und β -Casein-Fractionen von C_U , dann fällt die kleinere Auswanderung der $C_{R, 120}$ -Banden auf. Auch das elektrophoretische Verhalten von $C_{R, 120}$ zeigt gegenüber C_U eine starke Verringerung der trennbaren Komponenten und eine Abnahme der negativen Überschubladung.

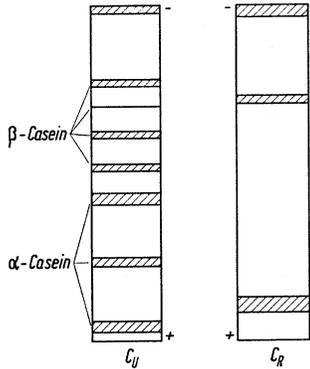


Abb. 3. *Elektrophorese von Casein und mit Äthanal umgesetztem Casein in Polyacrylamidgel. Veronalpuffer $P_n 8,9$; $\Gamma/2 = 0,5$; $4,8 m$ -Harnstofflösung; $20 V/cm$, $45 min$*

Das Verhalten von C_U und $C_{R, 120}$ bei der *Sedimentation in einem Saccharosegradienten* ist auch deutlich unterschiedlich (Abb. 4).

Bei beiden Caseinen sind zwei Banden vorhanden, deren Mengenverhältnis sich mit der Zentrifugationsdauer verschiebt. In allen Fällen ist aber bei $C_{R, 120}$ der Anteil an der schneller sedimentierenden Komponente größer als bei C_U . Die daraus abzuleitende Vergrößerung des Molekulargewichts durch die Reaktion mit Äthanal folgt auch aus dem Verhalten von C_U und $C_{R, 120}$ bei der Gelfiltration. Abb. 5 zeigt eine Eichkurve, die mit 8 verschiedenen Proteinen von bekanntem Molekulargewicht für Sephadex G 100 aufgestellt wurde. Alle gemessenen Werte liegen in guter Näherung auf einer Geraden, wenn $\sqrt[3]{K_a}$ gegen $\sqrt{Mol.-Gew.}$ aufgetragen wird. C_U liefert unter den gleichen Bedingungen zwei Peaks (Abb. 6). Aus den K_a -Werten folgen aus der Eichkurve für die Molekulargewichte der beiden Komponenten Werte von 44100

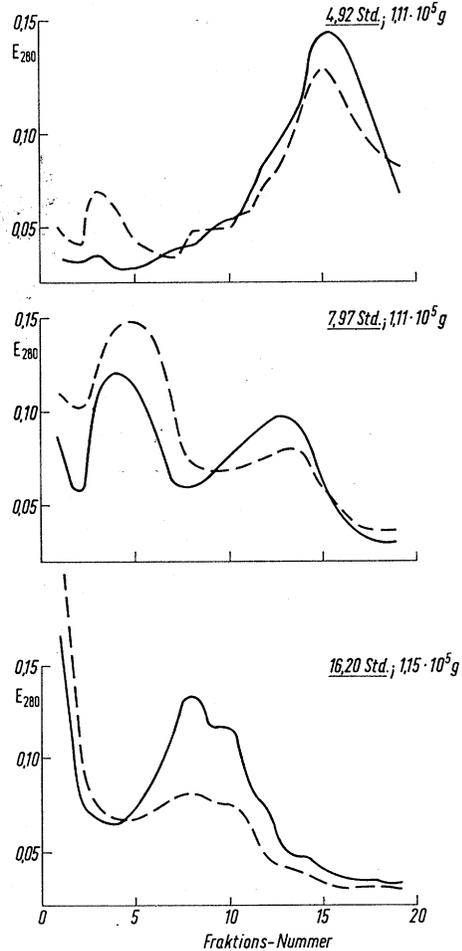


Abb. 4. *Sedimentationsdiagramme von Casein und mit Äthanal umgesetztem Casein. C_U : —, C_R : - - - (jeweils $0,55 ml$)*

und 54800. $C_{R, 120}$ erscheint in einem Peak (Abb. 6) mit $K_d = 0$. Das entspricht einem Molekulargewicht $> 115\ 000$. Die *tryptische Spaltbarkeit* von Casein nimmt mit zunehmender Dauer der Äthanal-Einwirkung ab (Abb. 7). Das drückt sich auch in der Abnahme der bei Dünnschichtchromatographie eines tryptischen Hydrolysates von

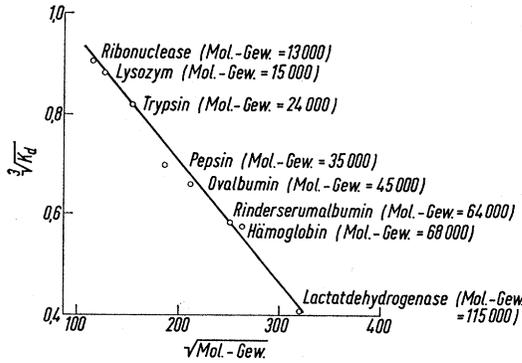


Abb. 5. Eichkurve zur Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G 100

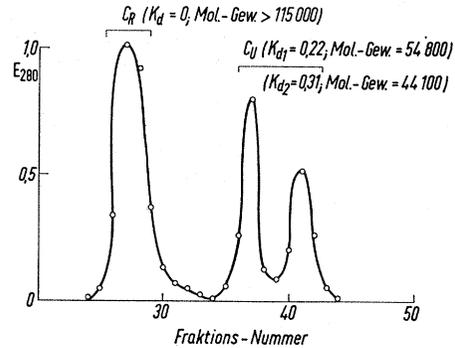


Abb. 6. Elutionsdiagramme von Casein und mit Äthanal umgesetztes Casein an Sephadex G 100 (jeweils 4 ml)

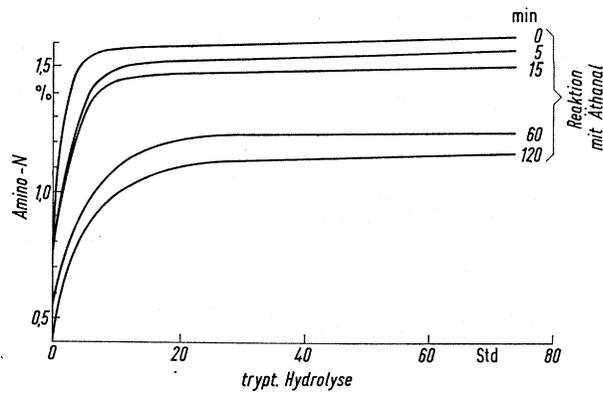
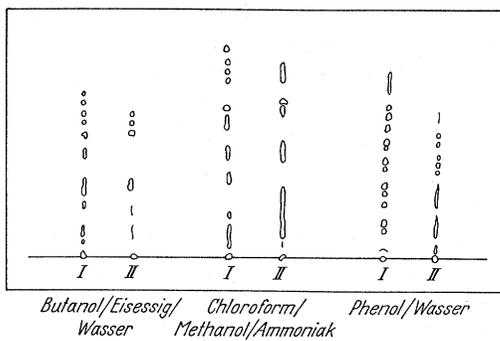


Abb. 7. Tryptische Hydrolyse von mit Äthanal unterschiedlich lange umgesetztem Casein



C_U und $C_{R, 120}$ auftretenden Spaltpeptide aus (Abb. 8). Die für die Hydrolyse von C_U und $C_{R, 120}$ bestimmten Michaeliskonstanten und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sind in Tab. 1 enthalten.

Abb. 8. Dünnschichtchromatographische Trennung von tryptischen Casein- und mit Äthanal umgesetzten Caseinhydrolysaten. I = Casein (C_U), II = Casein, umgesetzt (C_R)

Tabelle 1. Michaeliskonstanten (K_M) und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten (E_{max}) für die Hydrolyse von C_U und $C_{R,120}$ durch Trypsin

Protein	K_M mg/ml	E_{max}
C_U	2,18	1,58
$C_{R,120}$	3,77	2,10

* Gemessen nach Hydrolyse der DNP-Proteine und chromatographischer Abtrennung von ϵ -DNP-Lysin.

** Direkt am DNP-Protein gemessen. Berechnung nach BATTERSBY und CRAIG (15) mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 14500.

Tabelle 2. Lysingehalt von C_U und $C_{R,120}$, ϵ -DNP-Lysingehalt und DNP-Reste von DNP- C_U und DNP- $C_{R,120}$ (alle Werte in Aminosäureresten pro 16000 g N)

Protein	Lysin	ϵ -DNP-Lysin*	DNP-Reste**
C_U	59	—	—
$C_{R,120}$	57	—	—
DNP- C_U	—	31	24,4
DNP- $C_{R,120}$	—	25	15,4

Der K_M -Wert von $C_{R,120}$ ist deutlich erhöht, ebenso die maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

In Tab. 2 sind die Ergebnisse der Umsetzung mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (DNFB) zusammengestellt.

Nur 31 der laut Aminosäureanalyse vorhandenen 59 Lysinreste reagieren mit DNFB. Durch den Umsatz mit Äthanal sind weitere 6 Lysinreste nicht mehr reaktionsfähig. Aus der Aminosäureanalyse ergab sich jedoch nur eine Differenz von 2 Lysinresten zwischen C_U und $C_{R,120}$. Diese Abweichung könnte auf einer Freisetzung von ursprünglich durch die Reaktion mit Äthanal blockierten Lysinresten unter den Bedingungen der sauren Hydrolyse beruhen. Da sich aber in Versuchen mit Lysin keine Anhaltspunkte für eine derartige Rückspaltung ergaben, ist es wahrscheinlich, daß bei $C_{R,120}$ durch Vernetzungsreaktionen zwischen Peptidketten auch Aminosäurereste, die nicht mit Äthanal reagiert haben, so im Molekül begraben sind, daß sie nicht mit FDNB reagieren können. Die direkte Bestimmung der DNP-Reste in den nicht hydrolysierten DNP-Proteinen ergab ebenfalls eine starke Abnahme nach Umsatz mit Äthanal. Auffallend ist nur, daß diese Werte niedriger liegen als die für ϵ -DNP-Lysin, obwohl sie höher zu erwarten wären.

Diskussion

Über Reaktionen zwischen Carbonylverbindungen und Proteinen ist — im Gegensatz zu den sehr intensiv bearbeiteten Umsetzungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen — nicht viel bekannt. MOHAMMAD (16) fand eine Bräunung von Rinderserumalbumin durch Äthanal bei pH 7,8. ROBERT und Mitarb. (17, 18, 19) konnten in einer Reihe von Arbeiten zeigen, daß bei der Reaktion zwischen Proteinen und Äthanal die freien NH_2 -Gruppen abnehmen und daß die enzymatische Spaltbarkeit (Trypsin, Papain) herabgesetzt wird. Entsprechend sinkt das N/C-Verhältnis. MILCH (20) fand, daß Aldehyde, die überwiegend in der Hydratform vorliegen, zu Quervernetzungen von Peptidketten führen. Die bei der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse liegen in der gleichen Richtung. Verschiedene analytische Methoden zeigten deutlich Veränderungen am Casein nach Einwirkung von Äthanal. Die Zahl der durch Chromatographie an DEAE-Cellulose und Elektrophorese in Polyacrylamidgel trennbaren Komponenten ist bei $C_{R,120}$ stark herabgesetzt gegenüber C_U . Zusammen mit der ebenfalls beobachteten Abnahme der negativen Überschuldung bei $C_{R,120}$ deutet dieses Verhalten auf eine Vernetzung von Peptidketten. Da Äthanal an NH_2 -Gruppen — also an kationischen Gruppen — angreifen wird, ist es naheliegend, das scheinbare Abnehmen anionischer Gruppen mit ihrer Einbettung in das

Innere einer stärker vernetzten Struktur zu erklären. Zu analytisch ähnlichen Ergebnissen gelangte NISHIKAWA (22) durch Erhitzen von Rindermagermilch auf 70–120° C. Das Erhitzen verursachte einige Veränderungen im chromatographischen Verhalten an DEAE-Cellulose. Die Veränderungen bestanden darin, daß Schwanzbildung („tailed“-peak) zwischen der Position des α - und β -Caseins und eine Steigerung der mit Alkali eluierten Fraktion erhalten wurde.

Die Reaktion mit FDNB läßt ebenfalls auf eine Vernetzung durch Äthanal schließen, weil die Differenz der durch FDNB erfaßbaren Lysinreste bei C_U und $C_{R, 120}$ wesentlich größer ist als die Differenz der nach Aminosäureanalyse vorhandenen Lysinreste. Darüber hinaus zeigt die Reaktion mit FDNB, daß ein Teil der Lysinreste durch Äthanal blockiert wird. Über ähnliche Ergebnisse der FDNB-Reaktion berichten ANDREWS u. Mitarb. (23), die die Autoxydationsprodukte von Methyllinoleat-Gelatine und Methyllinoleat-Insulin untersuchten.

Die Entstehung von Produkten mit höherem Molekulargewicht bei der Einwirkung von Äthanal auf Casein folgt auch aus dem Verhalten von $C_{R, 120}$ bei der Sedimentation und bei der Gelfiltration.

Die Spaltbarkeit von Casein durch Trypsin nimmt mit zunehmender Dauer der Äthanaleinwirkung ab. Bei $C_{R, 120}$ ist eine beträchtliche Verringerung der Affinität zum Enzym festzustellen. Dagegen ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei Enzymsättigung erhöht.

Zusammenfassung

Casein wurde mit Äthanal umgesetzt und die Reaktion mit verschiedenen analytischen Methoden verfolgt. Die Zahl der durch Ionenaustauschchromatographie und durch Gelelektrophorese trennbaren Komponenten nimmt dabei stark ab. Die entstehenden Produkte haben höhere Molekulargewichte und werden durch Trypsin weniger angegriffen. Die Michaeliskonstanten sind erhöht. Die Anzahl der mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol erfaßbaren Lysinreste ist kleiner.

Summary

Whole casein shows some remarkable changes in analytical behaviour after treatment with ethanal at pH 6,5 and room temperature for 120 min.

The number of peaks, separated by chromatography on DEAE-cellulose is decreased and the positions of the peaks are changed. Electrophoresis in polyacrylamide-gel also showed a decrease in the number of zones and electrophoretic mobilities.

An increase in molecular weights follows from gel filtration and sedimentation experiments. The cleavage of modified casein by trypsin is diminished; the K_M -value is increased from 2,18% to 3,77%. The number of ϵ -amino groups, detectable with fluorodinitrobenzene, is decreased.

Probably ethanal causes an crosslinking of peptide chains of casein.

Literatur

1. BRUNNER, J. R., C. W. DUNCAN u. G. M. TROUT: Food Res. **18**, 454 (1953).
2. BRUNNER, J. R., H. A. LILLEVIK, G. M. TROUT, u. C. W. DUNCAN: Food Res. **18**, 463 (1953).
3. BRUNNER, J. R., G. M. TROUT u. C. W. DUNCAN: Food Res. **18**, 469 (1953).
4. SCHORMÜLLER, J., u. M. WALTHER: Diese Z. (im Druck).
5. HIPPEL, N. J., M. L. GROVES u. T. L. MCMEEKIN: J. Dairy Sci. **35**, 272 (1952).
6. YAGUCHI, M., N. P. TARASSUK u. H. G. HUNZIKER: J. Dairy Sci. **44**, 589 (1961).
7. BLOEMENDAL, J. F., F. JONKINA u. J. H. WISSE: Chem. Weekbl. **58**, 501 (1962).
8. BARKA, T.: J. Histochem. Cytochem. (Baltimore) **9**, 542 (1961).
9. MARTIN, G. R., u. B. N. AMES: J. biol. Chem. **236**, 1372 (1961).
10. SVENSSON, H.: Zonal density gradient electrophoresis. in: A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry. Von P. ALEXANDER u. J. R. BLOCK. Bd. I, S. 212. London: Pergamon Press 1960.
11. IWATSUBO, M., u. A. CURDEL: C. R. Acad. Sci. (Paris) **256**, 5224 (1952).
12. MOORE, S., u. W. H. STEIN: J. biol. Chem. **192**, 663 (1951).
13. MOORE, S., u. W. H. STEIN: J. biol. Chem. **211**, 893 (1957).
14. LINEWEAVER, H. u. D. BURK: J. Amer. chem. Soc. **56**, 658 (1934).
15. BATTERSBY, A. R. u. L. CRAIG: J. Amer. chem. Soc. **74**, 4023 (1952).
16. MOHAMMAD, A., H. S. OLCOTT u. H. FRAENKEL-CONRAT: Arch. Biochem. **24**, 270 (1943).
17. ROBERT, L., u. F. S. PENARANDA: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **35**, 791 (1953).
18. ROBERT, L., u. N. NOLLA: Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **35**, 807 (1953).
19. ROBERT, L., J. POLONOWSKI u. V. BAJIC: Experientia (Basel) **12**, 59 (1956).
20. MILCH, R. A.: Gerontologia **10**, 117 (1964/65).
21. HANNIG, K.: Clin. Chim. Acta **4**, 51 (1959).
22. NISHIKAWA, J., N. ABE u. K. SAITO: Nippon Nogeikagaku Kaishi **40**, 11 (1966).
23. ANDREWS, F., J. BJORKSTEN, F. B. TRENK, A. S. HENICK, u. R. B. KOCH: J. Amer. Oil Chem. Soc. **42**, 779 (1965).